

Search Result

Rank 1 of 1

(c) 1998 Derwent Info Ltd. All rights reserved.

198942

Related WPI Acc No: 85-J24987

Immobilisation of substances - on crystalline protein membrane having layer of identical protein mols.

Patent Assignee: SARA M (SARA-I); SLEYTR U B (SLEY-I)

Inventor: SARA M; SLEYTR U B; SLEYTR U

Number of Countries: 013

Number of Patents: 008

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Main IPC	Week
WO 8909406	A	19891005	WO 89AT31	A	19890328		198942 B
WO 8909265	G	19950706	DE 509265	A	19890328	G01N-033/544	199008
AU 8934357	A	19891016					199015
EP 362339	A	19900411	EP 89903662	A	19890328		199104
JP 2504282	W	19901206	JP 89503929	A	19890328		199317
AU 634960	B	19930311	AU 8934357	A	19890328	G01N-033/544	199526
EP 362339	Bl	19950531	EP 89903662	A	19890328	G01N-033/544	199532
WO 89AT31	A	19890328					
DE 58909265	G	19950706	DE 509265	A	19890328	G01N-033/544	199532
EP 89903662	A	19890328					
WO 89AT31	A	19890328					
JP 2708590	B2	19980204	JP 89503929	A	19890328	C07K-017/02	199810
WO 89AT31	A	19890328					

Priority Applications (No Type Date): US 88174127 A 19880328; AU 8934357 A 19890328

Cited Patents: EP 154620; EP 166233; EP 173500; EP 184710; EP 189019; US 3979184

Patent Details:

Patent	Kind	Lat	Pg	Filing Notes	Application	Patent
WO 8909406	A	G	21			
EP 362339	A			Designated States (National): AU JP		
Designated States (Regional): AT BE CH DE FR GE IT LI LU NL SE						
AU 634960	E			Designated States (Regional): AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE	AU 8934357	
Based on				Based on	WO 8909406	WO 8909406
EP 362339	Bl	G	7	Based on		
Designated States (Regional): AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE						EP 362339
DE 58909265	G			Based on	WO 8909406	
Based on						
JP 2708590	B2		7	Previous Publ.		JP 2504282
Based on					WO 8909406	

Abstract (Basic): WO 8909406 A

Substances are immobilised on a flat, curved, cylindrical or vesicular membrane comprising at least one layer of identical protein

Copr. © West 1998 No Claim to Orig. U.S. Govt. Works

mol. in the form of a crystal lattice with a lattice constant of 1-50 nm.

USE - The process may be used to immobilise proteins, peptides, glycoproteins, carbohydrates, lipids, lipopolysaccharides, nucleic acids, haptens, dyes, metals, metal cpds., carbon, SiC2, polymers or drugs.

In an example, L111-69 membranes (1.5g wet wt.) were suspended in 50 ml of 0.1M Na cacodylate buffer (pH 7.2), treated with 0.5 ml of 50% glutaraldehyde, incubated at 20 deg.C for 20 min., treated with ethanalamine to stop the reaction, centrifuged and washed. The pellet (0.2g) was suspended in 8 ml H2O, treated with 60 mg 1-ethyl-3-dimethylamino apropyl-carbodiimide, maintained at pH 4.63 for 80 min., centrifuged and washed. The pellet was incubated with a soln contg. 2 mg/ml poly-L-lysine at 20 deg. C for 4 hr., centrifuged and washed to give an immobilised poly-L-lysine prod..

Dwg.0/0

Abstract (Equivalent): EP 362339 F

Use of a membrane which extends along planar, curved or vesicular surfaces and consists of at least one layer of identical, protein-containing molecules arranged in the form of a crystal lattice with a lattice constant of 1 to 50 nm and on which is immobilised a substance from the group comprising enzymes or coenzymes, antigens, antibodies, biotin, avidin, lectins, protein A, haptens, lipid molecules, lipopolysaccharides, nucleic acids or mediator or transmitter molecules, as an enzyme membrane and/or ELISA membrane and/or diagnostic reagent and/or sensor membrane.

Dwg.0/0

Title Terms: IMMOBILISE; SUBSTANCE; CRYSTAL; PROTEIN; MEMBRANE; LAYER; IDENTICAL; PROTEIN; MOLECULAR

Derwent Class: A88; A96; B04; B07; D15; D16; J01; J04; Q34; S03

International Patent Class (Main): C07K-017/02; G01N-033/544

International Patent Class (Additional): A61K-009/00; A61K-047/42;

A61K-047/48; C12N-011/02; C12Q-001/68; G01N-033/54; G01N-033/543;

G01N-033/549; G01N-033/553

File Segment: CPI; EPI; EngPI

Manual Codes (CPI/A-N): A12-W11L; B03-K; B04-B01B; B04-B04A; B04-B04C; B04-C02; B04-C03D; B05-A01B; B05-A03; B05-B02C; B05-C06; B11-C07A; B11-C08; B12-K04; B12-M10; D05-H09; D05-H10; J04-B01; J04-E03

Manual Codes (EPI/S-X): S03-E14H4

Plasdoc Codes (KS): 0036 0231 1986 2020 2095 2174 2300 2432 2551 2653 3266

2718 2726 3270 3272 2766 3288

Polymer Fragment Codes (PF):

001 014 04- 231 256 341 344 347 358 431 438 443 473 477 48- 506 509 51& 525 53& 56& 57& 575 595 623 624 642 645 681

Chemical Fragment Codes (M1):

01 B114 B415 B701 B702 B713 B720 B815 B831 C106 C108 C800 C802 C803

C804 C805 C807 C810 D011 D012 E720 H100 H101 H181 H182 H721 H722

J011 J012 J171 J272 J521 L921 M125 M231 M262 M280 M282 M312 M313

...
Copr. © West 1998 No Claim to Orig. U.S. Govt. Works

M314 M315 M321 M332 M342 M343 M349 M372 M381 M383 M391 M392 M423
M510 M511 M520 M530 M540 M620 M720 M903 N104 P831 Q233 Q435 R032
R043 R052 V500 V540 V600 V611 V735 V741 V742 V743 V752 V753 V771
V772 V791 V792 V794 V801 V802 V810 V811 V902 00945

Ring Index Numbers:

00945

END OF DOCUMENT

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁴ :	G01N 33/544, C12N 11/02 G01N 33/553, C12Q 1/68 G01N 33/549, C07K 17/02 A61K 9/00	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 89/09406 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 5. Oktober 1989 (05.10.89)
(21) Internationales Aktenzeichen:	PCT/AT89/00031		SE (europäisches Patent), US.
(22) Internationales Anmelde datum:	28. März 1989 (28.03.89)		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>
(31) Prioritätsaktenzeichen:	174,127		
(32) Prioritätsdatum:	28. März 1988 (28.03.88)		
(33) Prioritätsland:	US		
(71)(72) Anmelder und Erfinder:	SLEYTR, Uwe, B. [AT/AT]; Parhamerplatz 10, A-1170 Wien (AT). SARA, Margit [AT/AT]; Vorgartenstr. 90/2/24, A-1200 Wien (AT).		
(74) Anwälte:	ITZE, Peter usw.; Amerlingstrasse 8, A-1061 Wien (AT).		
(81) Bestimmungsstaaten:	AT (europäisches Patent), AU, BE (europäisches Patent), CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent).		

(54) Title: PROCESS FOR IMMOBILIZING OR DEPOSITING MOLECULES OR SUBSTANCES ON A SUPPORT
(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR IMMOBILISIERUNG BZW. ABLAGERUNG VON MOLEKÜLEN BZW.

SUBSTANZEN AUF EINEM TRÄGER

(57) Abstract

In the process disclosed, the support is a structure consisting of at least one layer of molecules containing identical proteins extending along a flat, curved, cylindrical or vesicular surface, the molecules being arranged in the form of a crystal lattice with a lattice constant of 1 to 50 nm.

(57) Zusammenfassung

Verfahren zur Immobilisierung bzw. Ablagerung von Molekülen bzw. Substanzen auf einem Träger, wobei als Träger eine Struktur eingesetzt wird, welche wenigstens eine sich entlang ebener, gekrümmter, zylindrischer oder vesikulärer Flächen erstreckende Schicht identischer Proteine enthaltender Moleküle besteht, die in Form eines Kristallgitters mit einer Gitterkonstante von 1 bis 50 nm angeordnet sind.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
AU	Australien	GA	Gabun	MW	Malawi
BB	Barbados	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BE	Belgien	HU	Ungarn	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	IT	Italien	RO	Rumänien
BJ	Benin	JP	Japan	SD	Sudan
BR	Brasilien	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SN	Senegal
CG	Kongo	LI	Liechtenstein	SU	Soviet Union
CH	Schweiz	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CM	Kamerun	LU	Luxemburg	TG	Togo
DE	Deutschland, Bundesrepublik	MC	Monaco	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DK	Dänemark	MG	Madagaskar		
FI	Finnland	ML	Mali		

Verfahren zur Immobilisierung bzw. Ablagerung von Molekülen bzw.
Substanzen auf einem Träger

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Immobilisierung bzw. Ablagerung von Molekülen bzw. Substanzen auf einem Träger.

Bisher werden für die Immobilisierung von 5 Makromolekülen Polymere mit schwammartiger Struktur (Gele) von verschiedenem chemischen Aufbau (z.B. Agarose, modifiziertes Polyacrylamid) verwendet. Aufgrund der zufälligen Anordnung der Polymerketten mit unterschiedlichem Molekulargewicht in dem Gekörper weisen vorhandene funktionelle Gruppen weder eine definierte Position, noch 10 eine definierte Orientierung auf. Die Verteilung von funktionellen Gruppen an der Oberfläche und im Inneren der Gelmatrix ist daher "zufällig". Werden diese Gruppen für eine Immobilisierung von Makromolekülen aktiviert, so 15 wird auch die Anordnung der Fremdmoleküle in "zufälliger" Verteilung erfolgen.

Für die sogenannte Teststreifentechnologie (z.B. Glukose-Teststicks zur Bestimmung des Blut- oder 20 Harnzuckergehaltes) werden Enzyme in gelöster Form in Qualitätspapiere eingesaugt und getrocknet. Wie bei dem zuvor beschriebenen Gel liegen auch hier die Fremdmoleküle in statistischer Verteilung in der relativ groben Fasermatrix des Papiers vor. Ein weiterer Nachteil ist, 25 daß die Enzyme nicht kovalent gebunden sind, so daß es bei Untersuchungen im wässrigen Milieu zu Enzymverlusten kommen kann. Dadurch ist eine Quantifizierbarkeit des Analyten nicht mehr garantiert.

Um einerseits eine kovalente Bindung von Fremdmolekülen zu sichern, andererseits aber dünne Trägerfilme zu haben, wurden Proteinfilme aus Serum Albumin oder 30 Kollagen erzeugt. Durch Einbringen von Glutaraldehyd gelang es, den Proteinfilm zu vernetzen, und gleichzeitig Fremdmoleküle kovalent zu binden. Auch mit dieser Methode gelang es aber nicht, Fremdmoleküle in definierter

Position und Orientierung in monomolekularer Schicht kovalent an einen Trägerfilm zu binden.

Erfindungsgemäß wird nun als Träger eine Struktur eingesetzt, welche wenigstens eine sich entlang ebener, gekrümmter, zylindrischer oder vesikulärer Flächen erstreckende Membran aufweist, die aus wenigstens einer Schicht identischer Protein enthaltender Moleküle besteht, die in Form eines Kristallgitters mit einer Gitterkonstante von 1 bis 50 nm angeordnet sind. Dadurch wird erreicht, daß die immobilisierten Moleküle stets in räumlich definierter Anordnung an den mit den Substraten in Verbindung stehenden Oberflächen angeordnet sind, so daß eine möglichst dichte Belegung der freien Oberflächen mit den zu bindenden Molekülen ermöglicht ist. Die reaktiven Gruppen der Proteine nehmen nämlich nicht nur in der Polypeptidkette eine genau festgelegte Position ein, sondern haben auch nach Faltung des Proteins im Kristallgitter eine exakt festgelegte Lage und Orientierung. Dies gilt in gleicher Weise auch für an der Membran eventuell noch vorhandene Kohlenhydratanteile und deren Hydroxylgruppen.

Vorteilhafterweise kann eine Membran eingesetzt werden, die Poren mit einem Durchmesser von 0,5 bis 40 nm aufweist. Durch das Vorhandensein der Poren kann eine Behandlung des Substrats auch dadurch erreicht werden, daß dieses langsam durch die Membran hindurchgeführt wird, wobei dann während des Durchführens bzw. Entlangführens die gewünschte Umsetzung bzw. Reaktion durch die an der Membran immobilisierten Moleküle erfolgt. Weiters wird damit erreicht, daß die Membran beidseitig mit den Molekülen bzw. Substanzen beladen sein kann, da aufgrund der Poren das zu behandelnde Substrat an beide Seiten der Membran gelangen und dann reagieren kann.

Für die Veränderung der Oberflächeneigenschaften der Membran können auf dieser Protein- und/oder Peptidmoleküle immobilisiert werden. Dadurch wird unter anderem eine Oberflächenvergrößerung erreicht, wodurch für Immobilisierung weiterer Moleküle ein zusätzlicher Raum geschaffen wird, der aufgrund der definierten Anordnung der Protein- und/oder Peptidmoleküle ebenfalls genau definierte Raumstruktur aufweist. Weiters kann dadurch erreicht werden, daß die Oberfläche entweder hydrophil 5 bzw. hydrophob wird. Durch solche Veränderungen der Oberflächeneigenschaften wird unter anderem auch erzielt, daß die Membranen eine geringer unspezifische Adsorption 10 aufweisen. Gleiche Eigenschaften können auch dadurch erzielt werden, daß auf der Membran Glycoproteine- und/oder Glycopeptidmoleküle immobilisiert werden. Ebenso 15 können auf der Membran Polysaccharide und/oder Oligosaccharide und/oder Zucker immobilisiert werden, wobei all die angeführten Moleküle je nach dem späteren Verwendungszweck eingesetzt werden können.

20 Es können jedoch zur Erzielung dieser Eigenschaften auch Lipidmoleküle immobilisiert werden, wobei diese Moleküle zusätzlich noch für die Aufbringung von monomolekularen Lipidschichten, z.B. Langmuir Blodgett- 25 Polymerschichten, insbesondere hydrophobe Membranen, dienen können, oder aber als Träger für andere dienen können. Für spezielle Zwecke können auch auf der Membran Lipopolysaccharide immobilisiert werden, welche 30 gleichfalls die angeführten Effekte erbringen können.

Für einen Einsatz bei enzymatischen Umsetzungen 35 können auf der Membran Enzyme und/oder Coenzyme immobilisiert werden. Soll die erfindungsgemäße Membran für biotechnologische Zwecke verwendet werden, dann kann auf der Membran eine Substanz der Gruppe, enthaltend Antigene, Antikörper, Lektine, Biotin, Avidin, Protein A und Haptene, immobilisiert werden. Für gewisse Zwecke

können auch Nucleinsäuren immobilisiert werden, welche sich unter anderem auch für Hybridisierungstests und Sondenmoleküle in der Gentechnologie eignen.

Wenn auf der Membran Farbstoffe, insbesondere 5 Fluoreszenzfarbstoffe, immobilisiert werden, dann kann die erfindungsgemäße Membran als Testmembran dienen, z.B. als Indikatormembran bzw. als Membran, welche insbesondere für optoelektronische Auswertung (optische Sensoren) geeignet ist. Es können dabei für die Auswertung 10 Membrangruppen verwendet werden, von welchen jede Membran einen unterschiedlichen Farbstoff aufweist, so daß gleichzeitig unterschiedliche Reaktionen gemessen werden können.

Es können auf der Membran, gegebenenfalls leitende, 15 Materialien, wie Metalle und/oder Metallverbindungen und/oder Kohlenstoff und/oder Siliciumoxide und/oder Kunststoffe immobilisiert bzw. abgelagert werden. Dadurch ist die Möglichkeit gegeben, die Membranen für Sensoren einzusetzen, und zwar beispielsweise als biologische 20 Feldeffekttransistoren oder chemische Feldeffekttransistoren, da die geschaffenen Strukturen ionenselektiv sind und damit als sogenannte ionenselektive Feldeffekttransistoren (ISFET) eingesetzt werden können. Für die 25 Steuerung der Struktur bzw. die physikalischen Eigenschaften und Herstellung von Legierungen auf der Membran können Mischungen der Materialien bzw. getrennte Schichten mehrerer Materialien abgelagert werden.

Um eine gesteuerte Elektronenübertragung bzw. 30 Ionenableitung aus dem Medium zu erzielen, können auf der Membran Mediator- bzw. Transmittermoleküle immobilisiert werden. Um bei enzymgesteuerten Prozessen ein leichtes Rückgewinnen der eingesetzten Enzyme zu erzielen, kann eine Membran mit darauf immobilisierten Enzymen und/oder Coenzyme als Enzymmembran verwendet werden. Es wird dann 35 das Substrat mit der Enzymmembran in Kontakt gebracht

bzw., wenn die Membran vesikuläre Form hat, diese Vesikel in dem Substrat suspendiert, wonach dann nach Beendigung der Reaktion das Substrat von der Membran getrennt wird bzw. die Vesikel, z.B. durch Filtration, abgeschieden werden.

In besonders bevorzugter Weise kann eine Membran mit darauf immobilisierten Antigenen, Antikörpern, Lektinen, Biotin, Avidin, Protein A oder Haptenen als ELISA-Membran verwendet werden. Für die Durchführung von Diagnosereaktionen kann eine Membran mit darauf immobilisierten Enzymen, bzw. Coenzymen, Antigenen, Antikörpern, Biotin, Avidin, Lektinen, Protein A, Haptenen, Nucleinsäuren oder Mediator- bzw. Transmittermolekülen als Diagnosereagens verwendet werden. Insbesondere bei den Enzymen ist eine Biolumineszenzreaktion interessant, weil dadurch eine lichtoptische Auswertung von Reaktionen ermöglicht ist. Eine Membran mit darauf immobilisierten Enzymen bzw. Mediator- bzw. Transmittermolekülen, kann auch als Sensormembran verwendet werden, welche einen direkten Einsatz für die Prüfung von Substanzen auf vorhandene Komponenten ermöglicht. Für bestimmte Formen der Signalableitungen, insbesondere für Redoxsysteme, können die an der Membran immobilisierten Substanzen und die Membran mit einer leitenden Schicht, z.B. Metall oder leitendem Kunststoff, versehen werden. In besonders einfacher Weise kann die leitende Schicht durch Sputtern aufgebracht werden. Für bestimmte Materialien kann es jedoch angezeigt sein, daß die leitende Schicht durch Aufdampfen aufgebracht wird. Schließlich kann die Kunststoffschicht durch Plasmapolymerisation aufgebracht werden.

Für eine gesteuerte Freisetzung der abgelagerten bzw. immobilisierten Substanzen, insbesondere bei

pharmazeutischen Wirkstoffen, können diese Substanzen von der Membran eingeschlossen sein.

Die Erfindung wird nachstehend noch anhand von Beispielen näher erläutert.

5

Beispiel 1:

Immobilisierung von Poly-L-Lysin an kristallinen Proteinmembranen (S-Schichten)

10 Vesikuläre Strukturen, die aus kristallinen Proteinmembranen von Clostridium thermohydrosulfuricum L111-69 bestehen, werden zur Stabilisierung mit Glutaraldehyd vernetzt. Dazu werden 0.5 g feuchtes Pellet der vesikulären Strukturen (erhalten nach Zentrifugation bei 15 20,000 x g) in 50 ml 0.1 M Natrium-Cacodylat-Puffer, pH 7.2, suspendiert und nach Zugabe von 0.5 ml Glutaraldehyd 20 (50 %) 20 Minuten bei 20° C inkubiert. Nach Stoppen der Reaktion durch Zugabe von Äthanolamin wird die Suspension 25 gewaschen und neuerlich pelletiert. Zur chemischen Aktivierung der Carboxylgruppen werden 0.2 g des erhaltenen Pellets in 8 ml Aqua dest. suspendiert, 60 mg 1-Ethyl-3,3' dimethyl(aminopropyl)carbodiimid (EDC) zugefügt, der pH-Wert der Suspension durch Zugabe von 0.1 30 N NaOH oder 0.1 N HCl auf 4.63 eingestellt und dieser während der 80 Minuten dauernden Reaktion konstant gehalten. Nach Zentrifugation bei 20,000 x g wird das Pellet mit eiskaltem Aqua dest. gewaschen und nach 35 neuerlichem Zentrifugieren bei 20,000 x g in einer Lösung aus Poly-L-Lysin (MG 30,000 ; 2 mg/ml Aqua dest.) suspendiert. Nach 4-stündiger Inkubation bei 20° C wird zur Entfernung von nicht kovalent gebundenem Poly-L-Lysin zentrifugiert, mit Aqua dest., und in der Folge mit 0.1 M Kaliumphosphat Puffer (pH 7.0) gewaschen.

Durch Immobilisierung von Poly-L-Lysin können aufgrund der freien Aminogruppen der im Polymer vorhandenen Lysinreste die Oberflächeneigenschaften der vesikulären Strukturen (Proteinfragmente) gezielt verändert und eine positive Nettoladung erzeugt werden. Zudem können die vorhandenen Aminogruppen für eine Immobilisierung von weiteren Fremdmolekülen aktiviert werden.

Beispiel 2:

10

Immobilisierung von Phosphatidylethanolamin

Vesikuläre Strukturen werden, wie oben beschrieben, zur chemischen Stabilisierung mit Glutaraldehyd vernetzt und an der kristallinen Matrix vorhandene Carboxylgruppen mit EDC aktiviert. Nach einer Aktivierungszeit von 80 Minuten wird die Suspension bei 20,000 x g zentrifugiert, die Pellets mit Dioxan bei einer Temperatur von 4° C gewaschen und neuerlich sedimentiert. In der Folge werden die Pellets in einer Lösung aus Phosphatidylethanolamin (PE; 3 mg/ml Dioxan) gelöst und 20 h bei 20° C inkubiert. Zur Entfernung von nicht kovalent gebundenem PE werden die vesikulären Strukturen nach dem Zentrifugieren fünfmal mit Dioxan und anschließend mit einer Mischung aus Chloroform-Methanol (50/50) gewaschen. Durch Reaktion der freien Aminogruppen von PE mit den Carboxylgruppen des S-Schicht-Proteins gelingt es, PE so an die kristalline Matrix zu binden, daß der hydrophile Teil zu der Membranoberfläche gerichtet ist, während die hydrophoben Reste nach außen exponiert bleiben. Die so erzeugte hydrophobe Oberfläche dient zur Anlagerung von Monoschichten aus Tensiden (z.B. Arachinsäure), die nun ihrerseits mit ihrem hydrophoben Teil binden, während der hydrophile Teil nach außen exponiert ist. Nun ist eine weitere Anlagerung einer Monoschicht von Arachinsäure

möglich, wobei nun die Moleküle mit ihrer hydrophilen Seite binden. Nach diesem Prinzip können mehrere Monoschichten von Tensidmolekülen an der Oberfläche einer kristallin geordneten vesikulären Struktur angeleget werden.

5

Beispiel 3:

10 Immobilisierung von Glucoseoxidase an kristallinen vesikulären Strukturen

Zur Immobilisierung von Glucoseoxidase werden vesikuläre Strukturen, wie oben beschrieben, mit Glutaraldehyd vernetzt, und in der Folge im Kristallgitter vorhandene 15 Carboxylgruppen mit EDC aktiviert. Nach dem Waschen mit Eiswasser und neuerlichem Zentrifugieren bei 20,000 x g wird das aktivierte Pellet aus vesikulären Strukturen in einer Lösung aus Glucoseoxidase (3 mg/ml Aqua dest.) 20 suspendiert und 6 Stunden bei 20° C inkubiert. In der Folge wird die Suspension zentrifugiert und, wie in Beispiel 1 beschrieben, zur Entfernung von nicht kovalent gebundenem Material gewaschen. Unter Anwendung dieser 25 Methode ist es möglich, 1 mg Glucoseoxidase pro mg S-Schicht-Protein kovalent zu binden. Das bedeutet, daß pro S-Schicht-Untereinheit ein Glucoseoxidase-Molekül immobilisiert werden kann, was der dichtest möglichen Packung eines Fremdmoleküls an einer kristallinen Matrix entspricht. Immobilisierte Glucoseoxidase zeigte im Vergleich zu dem nativen Enzym eine Aktivität von 50 %.

30

Beispiel 4:

Belegen von kristallinen S-Schichten mit einer Metallschicht

Kristalline geordnete Membranen (S-Schichten) werden in Aqua dest. suspendiert und unter einem Druck von 2 bar in einer 10 ml Ultrafiltrationszelle auf einen mikroporösen Träger (Mikrofiltrationsmembran aus Polycarbonat der Firma Nuclepore; Parendurchmesser 0.1 µm) angeschwemmt.

5 Die einzelnen Membranfragmente werden in der Folge mit Glutaraldehyd (0.5 % in 0.1 M Natrium Cacodylat Puffer, pH 7.0) vernetzt. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten wird durch Waschen mit Aqua dest. überschüssiges Reagens entfernt, die Mikrofiltrationsmembran mit den 10 abgelagerten Protein-Fragmenten der Ultrafiltrationszelle entnommen und luftgetrocknet. Anschließend wird die Struktur in eine Sputter Coater Anlage (Polaron Instruments) eingelegt und bis zu einem Vakuum von $5 \cdot 10^{-2}$ 15 Törr evakuiert. Nun wird durch Anlegen einer Spannung von 2.000 V bei einem Stromfluß von etwa 20 mA Gold auf die Oberfläche der kristallinen Membranfragmente gesputtert, wodurch eine zusammenhängende Metallschicht mit einer Stärke von etwa 40 nm erzeugt wird. Nach dem Entnehmen 20 aus der Sputter Coater Anlage wird die Struktur vorsichtig in ein mit Chloroform gefülltes Becherglas transferiert und so eingelegt, daß die Polycarbonat-Trägermembran mit der Flüssigkeit direkt in Kontakt kommt, wodurch das vorhandene Polymer aufgelöst wird. An der 25 Flüssigkeitsoberfläche verbleibt nun eine extrem dünne Struktur, die aus der Goldschicht und den darunterliegenden S-Schicht-Fragmenten besteht. Diese Struktur kann nun durch vorsichtiges Abheben auf beliebige Oberflächen aufgebracht werden. Durch Aufsputtern von Gold auf 30 kristallin geordnete Membranfragmente ist es möglich, einen direkten Kontakt zwischen Metall und dem Träger zu erzielen.

Beispiel 5:

Immobilisierung von Fluoreszenzfarbstoffen an kristallin
geordnete Strukturen

Vesikuläre Strukturen, die aus kristallin angeordneten
5 Proteinuntereinheiten bestehen, werden zur kovalenten
Bindung des Fluoreszenzfarbstoffes 7-Hydroxy-Cumarin-3-
-carbonsäure (HCC), der einen pH-sensitiven Farbstoff
darstellt, verwendet. 50 mg des Farbstoffes werden in
10 Aqua dest. aufgelöst, der pH-Wert durch Zugabe von 0.1 N
HCl oder 0.1 N NaOH auf 4,75 eingestellt und in der Folge
20 mg EDC zugesetzt. Nach einer Aktivierung der
Carboxylgruppen von HCC während einer Reaktionszeit von
80 Minuten wird dieser Ansatz mit 0,5 g feuchtem Pellet
15 vesikulärer Strukturen (erhalten nach Zentrifugation bei
20,000 x g) vermischt und die Suspension 2 Stunden bei
20° C inkubiert. Während dieser Zeit können die
20 EDC-aktivierten Carboxylgruppen von HCC mit freien
Aminogruppen des S-Schicht-Proteins reagieren und der
Farbstoff kovalent an die kristalline Matrix gebunden
werden. Zur Entfernung überschüssigen Reagens wird die
25 Suspension in einen vorgeweihten Dialysierschlauch
übergeführt und 48 h lang bei einer Temperatur von 4° C
gegen Aqua dest. dialysiert. Niedermolekulare Verbindun-
gen, wie HCC oder EDC, können während der Dialyse
entfernt werden. Die Suspension wird in der Folge
30 zentrifugiert, mit Aqua dest. und 1 N NaCl zur Entfernung
von unspezifisch adsorbiertem Material gewaschen. Der an
den vesikulären Strukturen immobilisierte Fluoreszenz-
farbstoff reagiert auf Änderungen des pH-Wertes im
entsprechenden Milieu durch eine Änderung in der
Wellenlänge der ausgesandten Fluoreszenz.

Beispiel 6:

Immobilisierung von Glucoseoxidase an kristalline Protein-Fragmente und Belegung mit einer Metallschicht

Die Immobilisierung von Glucoseoxidase erfolgt an 5 kristallin geordnete Protein-Fragmente, die auf einem mikroporösen Träger (Mikrofiltrationsmembran aus Nylon der Firma Pall; Porendurchmesser 0.1 μ m) abgelagert wurden. Die Mikrofiltrationsmembran wird in eine 10 Ultrafiltrationszelle mit einem Durchmesser von 25 mm eingelegt, und 3 ml einer Suspension, die die Protein-Fragmente enthält, werden auf die Membranoberfläche pipettiert. Nach Anlegen von einem Druck von 2 bar und 15 Ablagerung der Protein-Fragmente an der porösen Trägermembran wird vorhandenes Protein durch Zugabe von Glutaraldehyd (0.5 % in 0.1 M Natrium-Cacodylat-Puffer, pH 7.2) kovalent vernetzt. Nach dem Waschen der Membran mit Aqua dest. wird diese aus der Ultrafiltrationszelle 20 entnommen und in ein Becherglas, das 10 ml Aqua dest. enthält, eingelegt. Nach Zugabe von 50 mg EDC während der folgenden 80 Minuten auf 4.65 konstant gehalten. Durch Eintauchen der Membranen in Eiswasser lässt sich 25 überschüssiges Reagens entfernen. Die Membran wird in die Ultrafiltrationszelle nun so eingelegt, daß die mit Protein-Fragmenten belegte Seite nach oben gerichtet ist. In der Folge werden 2 ml einer Glucoseoxidase-Lösung (2 30 mg/ml) zugefügt und zur kovalenten Bindung des Enzyms 2 Stunden bei 20° C inkubiert. Nicht kovalent gebundenes Enzym kann durch Waschen mit Aqua dest. und Puffer (siehe oben) entfernt werden. Nach dem Entnehmen der Membran aus 35 der Ultrafiltrationszelle wird diese luftgetrocknet, in eine Sputter Coater Anlage (Polaron Instruments) eingelegt und bei einem Druck von $5 \cdot 10^{-2}$ Torr mit Platin bei einer Stromstärke von 20 mA während eines Zeitraumes von 2 min besputtert. Die Metallschicht, die eine Stärke

von 30 nm aufweist, ist direkt mit dem Enzym, das in dichtest möglicher Packung an eine kristalline Matrix gebunden ist, in Kontakt. Dadurch ist es möglich, daß die an dem Enzym während der enzymatischen Reaktion entstehenden Elektronen direkt von der Platinschicht abgesaugt werden.

Beispiel 7:

10 Herstellung von Diagnosemembranen unter Verwendung von Antikörpern

Als Ausgangsmaterial werden an mikroporöse Träger gebundene Protein-Fragmente verwendet. An der Oberfläche der Protein-Fragmente vorhandene Carboxylgruppen werden mit EDC aktiviert (Durchführung siehe o.a. Beispiele). Anschließend wird die aktivierte Membran in eine Ultrafiltrationszelle mit einem Durchmesser von 25 mm eingelegt und 2 ml einer Antikörper-Lösung (0.4 mg/ml) (Antikörper A, erzeugt gegen Virusprotein) auf die Membranoberfläche pipettiert und 4 Stunden bei 20° C inkubiert. Nach Abdekantieren der Antikörper-Lösung wird die Membran aus der Ultrafiltrationszelle genommen und 2 h mit 0.2 M Kalium-Phosphat-Puffer, pH 7.2, gewaschen. 25 Die Antikörper-Moleküle wurden im Zuge der Immobilisierung in Form einer Monoschicht in dichtest möglicher Packung an die Oberfläche der kristallinen Matrix gebunden. Die mit Antikörper beladene Membran kann daher zum Nachweis von Virusprotein verwendet werden. Dazu wird die Membran mit einer Flüssigkeit, die Viren enthält, in Kontakt gebracht und 2 h bei 20° C inkubiert. In der Folge wird zur Entfernung von überschüssigem Antigen mit 0.2 M Phosphat-Puffer, pH 7.0, und mit Aqua dest. 30 gewaschen. Zur quantitativen Auswertung der gebundenen Virusproteinmenge wird nun die Membran in eine weitere 35

Lösung, die biotinylierten Antikörper A enthält, gelegt (0.1 mg/ml 0.1 N Natriumhydrogencarbonat) und 30 Minuten inkubiert. Der biotinylierte Antikörper bindet nun an noch freie Haptene des Virusproteins. Nach Entnehmen der 5 Membran aus der Antikörper-Lösung wird diese wieder 20 Minuten mit 0.1 M Phosphat-Puffer, pH 8.0, gewaschen. Zur quantitativen Auswertung wird nun ein Peroxidase-Avidin-Konjugat eingesetzt. Avidin bindet spezifisch an Biotin, und demnach an den jeweiligen biotinylierten Antikörper. 10 Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten wird die Membran entnommen, wieder 20 Minuten mit Phosphat-Puffer gewaschen und schließlich 1 ml einer 0.01 % Wasserstoffperoxid-Lösung, die 1 mg des Farbstoffes o-Dienisidin 15 enthält, auf die Membran getropft. Nach 10 Minuten wird die Reaktion durch Zugabe von 5N HCl gestoppt und der gebildete Farbstoff quantitativ durch Messung bei einer Wellenlänge von 400 nm bestimmt. Über eine entsprechend erstellte Eichkurve kann die Menge an gebundenem Virusprotein gemessen werden.

20 Kristallin geordnete Protein-Fragmente bieten den Vorteil, daß der Antikörper A in dichtest möglicher Packung an eine definierte Oberfläche gebunden werden kann und dadurch die Nachweisgrenze für das zu untersuchende Protein entsprechend niedriger ist.

25

Beispiel 8:**Immobilisierung von biotinylierten Proteinen an vesikuläre Strukturen**

30 Vesikuläre Strukturen, die aus Proteinkristallen bestehen, werden entsprechend der oben angeführten Vorschrift chemisch mit Glutaraldehyd vernetzt und die an der Oberfläche vorhandenen Carboxylgruppen mit EDC 35 aktiviert. 0.1 g des feuchten, EDC-aktivierten Pellets

werden mit 2 ml einer Lösung von biotinyliertem Ovalbumin (1 mg/ml Aqua dest.) vermischt und 2 h bei 20° C inkubiert. Anschließend wird bei 20,000 x g zentrifugiert und das Pellet fünfmal mit 0.1 M Kalium-Phosphat-Puffer, 5 pH 7.0, gewaschen. Pro Protein-Untereinheit der kristallinen Matrix konnten 2 Moleküle von biotinyliertem Ovalbumin gebunden werden, was wieder der dichtest möglichen Bindungsdichte eines Fremdmoleküles an eine kristalline Matrix entspricht. Immobilisiertes 10 biotinyliertes Ovalbumin kann nun durch Zugabe von Avidin-Peroxidase-Konjugat und im folgenden durch Messung des entwickelten Farbstoffes durch Peroxidase-Aktivität nachgewiesen werden. Dazu werden 50 mg des feuchten Pellets aus vesikulären Strukturen mit daran immobilisierten 15 biotinylierten Ovalbumin in 1 ml 0.1 M Natriumhydrogencarbonat, pH 8.5, suspendiert und 200 µl 0.2 % Avidin-Peroxidase-Konjugat dazugefügt. Nach 20 Minuten Inkubation bei 20° C wird zentrifugiert, das Pellet fünfmal mit 0.2 M Kalium-Phosphat-Puffer (pH 7.0) gewaschen und 20 mg des Pellets (bestehend aus 20 vesikulären Strukturen, biotinyliertem Ovalbumin und daran gebundenen Avidin-Peroxidase-Konjugat) mit 200 µl einer Lösung von 0.01 % Wasserstoffperoxid, die 1 mg o-Dianisidin enthält, vermischt. Der entwickelte 25 Farbstoff wird, wie oben beschrieben, gemessen.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Immobilisierung bzw. Ablagerung von Molekülen bzw. Substanzen auf einem Träger, dadurch gekennzeichnet, daß als Träger eine Struktur eingesetzt wird, welche wenigstens eine sich entlang ebener, 5 gekrümmter, zylindrischer oder vesikulärer Flächen erstreckende Membran aufweist, die aus wenigstens einer Schicht identischer Protein enthaltender Moleküle besteht, die in Form eines Kristallgitters mit einer Gitterkonstante von 1 bis 50 nm angeordnet sind.
- 10 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine Membran eingesetzt wird, die Poren mit einem Durchmesser von 0,5 bis 40 nm aufweist.
- 15 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß auf der Membran Protein- und/oder Peptidmoleküle immobilisiert werden.
- 20 4. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß auf der Membran Glycoprotein- und/oder Glycopeptidmoleküle immobilisiert werden.
- 25 5. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß auf der Membran Polysaccharide und/oder Oligosaccharide und/oder Zucker immobilisiert werden.
- 30 6. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß auf der Membran Lipidmoleküle immobilisiert werden.
- 35 7. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß auf der Membran Lipopolysaccharide immobilisiert werden.
- 40 8. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß auf der Membran Enzyme und/oder Coenzyme immobilisiert werden.
- 45 9. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß auf der Membran eine der Substanzen

der Gruppe enthaltend Antigene, Antikörper, Lektine, Biotin, Avidin, Protein A und Haptene immobilisiert werden.

10. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß auf der Membran Nucleinsäuren immobilisiert werden.

11. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß auf der Membran Farbstoffe, insbesondere Fluoreszenzfarbstoffe, oder Farbstoffgemische immobilisiert werden.

12. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß auf der Membran gegebenenfalls leitende Materialien, wie Metalle und/oder Metallverbindungen und/oder Kohlenstoff und/oder Siliciumoxide und/oder Kunststoffe immobilisiert bzw. abgelagert werden.

13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß Mischungen der Materialien bzw. getrennte Schichten mehrerer Materialien abgelagert werden.

14. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß auf der Membran Mediator- bzw. Transmittermoleküle immobilisiert werden.

15. Verfahren nach Anspruch 1, 2 und 8, dadurch gekennzeichnet, daß eine Membran mit darauf immobilisierten Enzymen und/oder Coenzymen als Enzymmembran verwendet wird.

16. Verfahren nach Anspruch 1, 2 und 9, dadurch gekennzeichnet, daß eine Membran mit darauf immobilisierten Antigenen, Antikörpern, Lektinen, Biotin, Avidin, Protein A oder Haptenen als ELISA-Membran verwendet wird.

17. Verfahren nach Anspruch 1 bis 11 und 14, dadurch gekennzeichnet, daß eine Membran mit darauf immobilisierten Enzymen bzw. Coenzymen, Antigenen, Antikörpern, Biotin, Avidin, Lektinen, Protein A, Haptenen,

Nucleinsäuren oder Mediator- bzw. Transmittermolekülen als Diagnosereagens verwendet wird.

18. Verfahren nach Anspruch 1 bis 11 und 14, dadurch gekennzeichnet, daß eine Membran mit darauf immobilisierten Enzymen bzw. Coenzymen, Antigenen, Antikörpern, Biotin, Avidin, Lektinen, Protein A, Haptenen, Nucleinsäuren oder Mediator- bzw. Transmittermolekülen als Sensormembran verwendet wird.

19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß die an der Membran immobilisierten Substanzen und die Membran mit einer leitenden Schicht, z.B. Metall oder leitendem Kunststoff, versehen werden.

20. Verfahren nach den Ansprüchen 12, 13 oder 18, dadurch gekennzeichnet, daß die leitende Schicht durch Sputtern aufgebracht wird.

21. Verfahren nach den Ansprüchen 12, 13 oder 18, dadurch gekennzeichnet, daß die leitende Schicht durch Aufdampfen aufgebracht wird.

22. Verfahren nach den Ansprüchen 12, 13 oder 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Kunststoffschicht durch Plasmopolymerisation aufgebracht wird.

23. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die abgelagerten bzw. immobilisierten Substanzen, insbesondere pharmazeutische Wirkstoffe, von der Membran eingeschlossen sind.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/AT 89/00031

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) *

According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC
 G 01 N 33/544, C 12 N 11/02, G 01 N 33/553, C 12 Q 1/68,
 Int. Cl. ⁴ G 01 N 33/549, C 07 K 17/02, A 61 K 9/00

II. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched ?

Classification System	Classification Symbols
Int. Cl. ⁴	G 01 N, C 12 N, B 01 D, C 12 Q
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched *	

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT *

Category	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
Y	EP, A, 0189019 (U.W. SLEYTR) 30 July 1986, see the whole document	1-23

Y	EP, A, 0154620 (U.W. SLEYTR) 11 September 1985, see the whole document	1-23

Y	EP, A, 0173500 (PALL CORP.) 5 March 1986, see claim 1	1-23

Y	EP, A, 0184710 (BAYER AG) 18 June 1986, see pages 5-7	1-23

Y	US, A, 3979184 (I. GIAEVER) 7 September 1976, see the whole document	12,13,19-21

A	EP, A, 0166233 (GÖDECKE AG) 2 January 1986	

* Special categories of cited documents: ¹⁰

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"Z" document member of the same patent family

IV. CERTIFICATION

Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report
26 June 1989 (26.06.89)	20 July 1989 (20.07.89)
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer
EUROPEAN PATENT OFFICE	

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO. AT 8900031
SA 27565**

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 11/07/89. The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP-A- 0189019	30-07-86	AT-A, B	382321	10-02-87
		WO-A-	8603685	03-07-86
		EP-A-	0207100	07-01-87
EP-A- 0154620	11-09-85	AT-A-	381463	27-10-86
		WO-A-	8504111	26-09-85
		JP-T-	61501619	07-08-86
		US-A-	4752395	21-06-88
EP-A- 0173500	05-03-86	US-A-	4693985	15-09-87
		CA-A-	1249781	07-02-89
		EP-A-	0280840	07-09-88
		GB-A-	2163434	26-02-86
		GB-A-	2199327	06-07-88
		JP-A-	61124868	12-06-86
EP-A- 0184710	18-06-86	DE-A-	3444939	12-06-86
		JP-A-	61140523	27-06-86
US-A- 3979184	07-09-76	DE-A, C	2623100	09-12-76
		FR-A, B	2312224	24-12-76
		GB-A-	1533286	22-11-78
		JP-A-	51148015	18-12-76
EP-A- 0166233	02-01-86	DE-C-	3419782	14-11-85
		JP-A-	61000095	06-01-86

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/AT 89/00031

I. KLASSEKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationsymbolen sind alle anzugeben) ⁶		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
Int Cl. 4 G 01 N 33/544, C 12 N 11/02, G 01 N 33/553, C 12 Q 1/68, G 01 N 33/549, C 07 K 17/02, A 61 K 9/00		
II. RECHERCHIERTE SACHGEBiete		
Recherchierter Mindestprüfstoff ⁷		
Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole	
Int Cl 4	G 01 N, C 12 N, B 01 D, C 12 Q	
Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen ⁸		
III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN⁹		
Art*	Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch Nr. 13
Y	EP, A, 0189019 (U.W. SLEYTR) 30. Juli 1986, siehe das ganze Dokument --	1-23
Y	EP, A, 0154620 (U.W. SLEYTR) 11. September 1985, siehe das ganze Dokument --	1-23
Y	EP, A, 0173500 (PALL CORP.) 5. März 1986, siehe Anspruch 1 --	1-23
Y	EP, A, 0184710 (BAYER AG) 18. Juni 1986, siehe Seiten 5-7 --	1-23
Y	US, A, 3979184 (I. GIAEVER) 7. September 1976, siehe das ganze Dokument --	12,13,19-21
A	EP, A, 0166233 (GÖDECKE AG) 2. Januar 1986 -----	
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen ¹⁰ : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist		
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
IV. BESCHEINIGUNG		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts	
26. Juni 1989	20. 07. 89	
Internationale Recherchenbehörde	Unterschrift des beauftragten Bediensteten	
Europäisches Patentamt	 P.C.G. VAN DER PUTTEN	

ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT
ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.

AT 8900031
SA 27565

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.
Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am 11/07/89.
Diese Angaben dienen nur zur Orientierung und erfolgen ohne Gewähr.

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
EP-A- 0189019	30-07-86	AT-A, B	382321	10-02-87
		WO-A-	8603685	03-07-86
		EP-A-	0207100	07-01-87
EP-A- 0154620	11-09-85	AT-A-	381463	27-10-86
		WO-A-	8504111	26-09-85
		JP-T-	61501619	07-08-86
		US-A-	4752395	21-06-88
EP-A- 0173500	05-03-86	US-A-	4693985	15-09-87
		CA-A-	1249781	07-02-89
		EP-A-	0280840	07-09-88
		GB-A-	2163434	26-02-86
		GB-A-	2199327	06-07-88
		JP-A-	61124868	12-06-86
EP-A- 0184710	18-06-86	DE-A-	3444939	12-06-86
		JP-A-	61140523	27-06-86
US-A- 3979184	07-09-76	DE-A, C	2623100	09-12-76
		FR-A, B	2312224	24-12-76
		GB-A-	1533286	22-11-78
		JP-A-	51148015	18-12-76
EP-A- 0166233	02-01-86	DE-C-	3419782	14-11-85
		JP-A-	61000095	06-01-86